

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**INFLUÊNCIA DA PRESSÃO PULPAR POSITIVA NA
DIFUSÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO DE UM
PRODUTO DE BRANQUEAMENTO ATRAVÉS DOS
TECIDOS DENTÁRIOS *IN VITRO* – ENSAIO PILOTO**

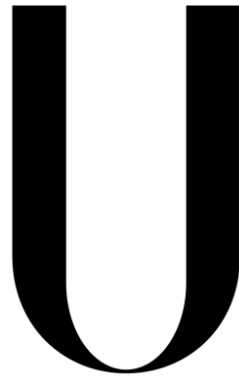
CATARINA GUERREIRO MARTINS CRÊSPO CARDOSO

DISSERTAÇÃO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**INFLUÊNCIA DA PRESSÃO PULPAR POSITIVA NA
DIFUSÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO DE UM
PRODUTO DE BRANQUEAMENTO ATRAVÉS DOS
TECIDOS DENTÁRIOS *IN VITRO* – ENSAIO PILOTO**

CATARINA GUERREIRO MARTINS CRÊSPO CARDOSO

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Duarte Nuno da Silva Marques

E co-orientada pelo Professor Doutor António Duarte Sola Pereira da Mata

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2015

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Duarte Marques agradeço pela confiança que depositou em mim para executar, com a sua orientação, o presente trabalho e por me inculcar, desde o primeiro dia, valores essenciais como espírito crítico, rigor científico e sentido de responsabilidade. Obrigada por partilhar o seu vasto conhecimento e motivar-me para nunca parar de aprender.

Ao Professor Doutor António Mata, pela oportunidade concedida de concretizar um projeto de cariz experimental, para mim tão motivante, integrada no Grupo de Investigação de Biologia e Bioquímica Oral (GIBBO) que, ao longo dos últimos cinco anos, se tornou uma segunda casa.

Ao Dr. João Silveira expresse a minha gratidão por toda a atenção e tempo despendidos; quer sob a forma de conselho ou palavra amiga, foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos companheiros: David Braz pela camaradagem diária, quer no laboratório ou na clínica; e Ruben Pereira, pela tua terna amizade e apoio incansável sempre que te foi possível. Agradeço ainda aos restantes investigadores e colaboradores do GIBBO que, de diversas formas, enriquecem a minha experiência académica.

Aos amigos Ivo Cavalheiro, Mónica Amorim e Sara Mendes, por fazerem desta jornada uma das maiores e melhores experiências que poderia imaginar. Obrigada pelas manhãs atarefadas, pelos almoços entre risos, pelas tardes intermináveis e noites inesquecíveis.

Aos amigos Xuxu Repas, João Valido Vaz e Bruno Macias por, mais longe ou mais perto, me acarinharem e fazerem felizes mesmo nos momentos mais sombrios.

À amiga de sempre e para sempre, Sara Alexandre, por perpetuamente me receber de braços abertos, onde quer que esteja. Obrigada por seres a irmã que nunca tive.

A toda a família que nunca duvidou de mim e me apoiou todos os minutos de todos os dias. À tia Maria Augusta Martins, por ser um exemplo de excelência em ciência e investigação. A tua dedicação, entrega e perseverança fazem-me querer ser como tu *quando for grande*. À querida Mimi Valério, onde sempre, no seu abraço, encontrei o amor de uma verdadeira avó.

A ti, Pai, por despertares em mim o gosto pelo conhecimento e me incentivares a nunca desistir dele.

A ti, Mãe, por seres um eterno porto seguro.

A ti, João, por tornares o mundo mais leve.

A ti, Avô

III

Influência da pressão pulpar positiva na difusão de peróxido de hidrogénio de um produto de branqueamento através dos tecidos dentários *in vitro* – ensaio piloto
Catarina Guerreiro Martins Crêspo Cardoso

Índice Geral

Resumo	6
Abstract.....	7
1. Introdução.....	8
a. Princípios ativos e mecanismo de ação dos produtos de branqueamento	8
b. Técnicas de branqueamento dentário.....	9
c. Efeitos adversos do branqueamento dentário.....	10
d. Efeitos do peróxido de hidrogénio no complexo pulpo-dentinário	11
e. Pressão pulpar positiva.....	13
f. Outros fatores que influenciam difusão de produtos através dos tecidos duros dentários	13
2. Objetivo e Hipóteses	15
3. Materiais e Métodos	16
a. Procedimentos experimentais	16
1. Titulação do conteúdo de PH do produto de branqueamento dentário.....	16
2. Montagem do modelo experimental de pressão pulpar positiva.....	16
3. Determinação da quantidade de PH que atinge a câmara pulpar	18
b. Variáveis	20
c. Análise Estatística	21
4. Resultados	22
4. Discussão.....	24
5. Conclusão	27
6. Referências Bibliográficas	28
Anexos	33
ANEXO I – Fotografias	33

Índice de Figuras

Esquema 1 – Determinação do efeito da pressão pulpar positiva na difusão de PH através dos tecidos duros dentários.	17
Esquema 2 – Representação da montagem experimental para cada grupo.	19
Figura 1 – Aplicação de PH na superfície vestibular de uma amostra do grupo C.	20
Figura 2 – Soluções da reta de calibração para a técnica de Leucocristal Violeta, com 9 pontos.	21
Gráfico 1 – Reta de calibração utilizada neste estudo.	21
Gráfico 2 – Comparação das médias, em miligramas, de: massa de PH inicialmente aplicado, massa de PH recuperado antes (controlo) e após o protocolo de branqueamento.	23
Gráfico 3 – Média da percentagem de PH recuperado na câmara pulpar, a partir do PH aplicado no gel de branqueamento, com e sem pressão.	24
Gráfico 4 – Média da quantidade, em miligramas, de PH recuperado em cada grupo experimental após o protocolo de branqueamento.	24
Tabela 1 – Distribuição aleatória das amostras em cada grupo experimental, consoante o tipo de dente - pré-molar ou canino.	19

Resumo

Objetivos: Verificar se a pressão pulpar positiva (PPP) altera a difusão de peróxido de hidrogénio (PH) para a câmara pulpar através dos tecidos dentários, após aplicação de um produto de branqueamento.

Desenho do estudo: Ensaio piloto *in vitro*.

Materiais e Métodos: 20 dentes pré-molares e caninos foram divididos em quatro grupos (n=5). Todos foram seccionados horizontalmente 2-3mm abaixo da junção amelo-cementária; o tecido pulpar foi removido e as coroas foram montadas em placas de policarbonato de forma a simular PPP em dentes inferiores e superiores (grupos A e B) e pressão pulpar 0 (grupos C e D), respetivamente. Registou-se, para cada amostra, a espessura vestibular, volume da câmara pulpar, áreas de aplicação e exposição. A câmara pulpar foi preenchida com solução tampão acetato 2M. Foram recolhidas amostras antes e após o protocolo de branqueamento com 40% de PH, 6x20 minutos, e subsequentemente analisadas através do método de Leucocristal Violeta. Previamente foi realizada a titulação do gel de branqueamento para determinar a concentração de PH presente no lote utilizado. Os dados foram analisados estatisticamente através dos testes U de Mann-Whitney, teste de Wilcoxon e correlação de Spearman, e a significância considerada foi de $p < 0,05$.

Resultados: Nos grupos A e B houve menores quantidade e percentagem de PH recuperado do interior da câmara pulpar, embora não estatisticamente diferentes entre eles ($p > 0,05$). Verificaram-se diferenças significativas entre quantidade de PH aplicado, recuperado, e controlo para todos os grupos ($p < 0,05$). Não foi possível estabelecer correlações entre espessura, volume da câmara pulpar e áreas de aplicação e exposição face à quantidade de PH recuperado.

Conclusão: A pressão pulpar positiva leva a uma diminuição, embora não estatisticamente significativa, da quantidade de PH que atingiu a câmara pulpar através dos tecidos dentários após aplicação de PH a 40%.

Palavras-Chave: branqueamento dentário, pressão pulpar positiva, violeta leucocristal, peróxido de hidrogénio.

Abstract

Objectives: Determine if positive pulpal pressure (PPP) changes the hydrogen peroxide (HP) diffusion through tooth's hard tissues into the pulpal chamber, after applying a bleaching agent.

Study design: *In vitro* pilot study.

Materials and Methods: 20 sound canines and premolars were divided into four groups (n=5). All of the samples were horizontally sectioned 2-3mm below the enamel-cementum junction; pulp tissue was removed and the crowns were fixed to polycarbonate simulating PPP in lower and upper teeth (groups A and B) and no pulpal pressure (groups C and D). For each sample was measured the vestibular thickness, pulp chamber volume and areas of application and exposure. The pulp chambers were filled with acetate buffer solution 2M. This solution was collected, from each sample, before and after the application of a bleaching gel containing 40% HP, and subjected to spectrophotometric analysis through the leuco-crystal violet method. Previously, the bleaching gel was titrated to determine the HP concentration in the used lot. Data was analyzed statistically through Mann-Whitney U test, Wilcoxon test and Spearman's correlation, with a p-value under 0.05.

Results: Groups A and B had less amounts and percentage of HP recovered from the pulp chamber, although not statistically different ($p > 0.05$). There were statistical differences between the amounts of HP applied on tooth surface, recovered, and control intervention ($p < 0.05$). No correlations were statistically relevant when analyzing tooth thickness, pulp chamber volume and areas of application and exposure versus the amount of HP recovered.

Conclusion: PPP reduces the amount of HP recovered from the pulp chamber after applying a tooth bleaching gel of 40% HP.

Keywords: tooth bleaching, tooth whitening, positive pulpal pressure, leuco-crystal violet, hydrogen peroxide.

1. Introdução

O branqueamento dentário é cada vez mais uma solução procurada por parte dos pacientes, sendo um procedimento comum em Medicina Dentária (Gökay *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2012). A partir da década de 80, com a técnica de Haywood (Haywood & Heymann 1989), este procedimento deixou de se focar apenas no branqueamento de dentes com tratamento endodôntico ou pigmentados por tetraciclinas (Hasson *et al.* 2006). A crescente valorização da estética na sociedade e na qualidade de vida do indivíduo levou a um aumento considerável do número de produtos de branqueamento no mercado, visto que a cor dos dentes representa um dos fatores mais valorizados pelos pacientes (Dannemand & Ozhayat 2014; Hasson *et al.* 2006; da Mata & Marques 2006; Meireles *et al.* 2014). É frequentemente recomendado pelo Médico Dentista por ser um método mais conservador face às alternativas existentes: microabrasão, facetas, coroas totais (Haywood 2006).

a. Princípios ativos e mecanismo de ação dos produtos de branqueamento

Os princípios ativos dos produtos de branqueamento são o peróxido de hidrogénio (PH), peróxido de carbamida (PC) e perborato de sódio, usados em diversas concentrações e formulações galénicas. Contudo, o agente branqueador é, direta ou indiretamente, o peróxido de hidrogénio (Travassos *et al.* 2010).

O peróxido de hidrogénio é um composto termicamente instável, com elevado poder oxidativo e capacidade de criar radicais livres (Oliveira *et al.* 2012). O modelo mais aceite para explicar o mecanismo de ação do branqueamento sugere que os radicais livres oxidam os cromóforos presentes na estrutura dentária, quebrando as suas cadeias aromáticas e dando origem a outras, de menores dimensões (Dahl & Pallesen 2003). No organismo humano, as espécies reativas de oxigénio (ERO), que incluem o PH, também estão envolvidas nas reações inflamatórias não específicas mediadas por fagócitos (Babior & Curnutte 1987). Durante esta resposta inflamatória os tecidos circundantes também são afetados, tendo as ERO a capacidade de causar danos e lise celular, bem como ativação de vias regulatórias da apoptose celular (Marques 2008).

b. Técnicas de branqueamento dentário

Existem três técnicas principais de branqueamento dentário externo: branqueamento em consultório (*in office*), administrado pelo Médico Dentista; em ambulatório (*at home*), dispensado pelo profissional de saúde oral; e de venda livre ao público (*over-the-counter*) (Kihn 2007).

A técnica *in office* pressupõe a utilização de produtos com maior concentração do agente branqueador (25-40% PH), que pode ser complementada com o uso de diversas fontes de luz ou calor (Alqahtani 2014). O gel de branqueamento é aplicado diretamente sobre a superfície dentária após isolamento dos tecidos moles. A rapidez do aparecimento de resultados - frequentemente logo na primeira consulta -, bem como a supervisão total por parte do Médico Dentista são as maiores vantagens desta técnica (Alqahtani 2014).

A técnica *at home* consiste na aplicação de produtos com menor concentração de agente branqueador (10-20% PC, que corresponde a 3,5-6,5% PH), prescritos pelo médico dentista mas administrados pelo paciente, em sua casa (Alqahtani 2014). A aplicação é realizada durante a noite, por meio de uma moldeira individualizada, no mínimo duas semanas. As suas vantagens são o menor tempo de cadeira, maior segurança e menores efeitos secundários, mas requer uma boa *compliance* por parte do paciente (Kihn 2007).

Atualmente existem ainda outros produtos, de venda livre (*over-the-counter*), à disposição do paciente, cujas concentrações são inferiores às dos produtos *at home*. Apresentam-se sob múltiplas formas - gel, tiras, moldeiras universais e vernizes – e podem ser adquiridos em várias superfícies comerciais. De acordo com o Comité Científico para o Uso de Produtos pelo Consumidor, a concentração máxima de PH nestes produtos é de 0,1% (SCCNFP 1999). Por carecerem de supervisão de um profissional de saúde oral e terem uma concentração de PH muito reduzida, a sua eficácia é questionada (Alqahtani 2014).

c. Efeitos adversos do branqueamento dentário

Existem efeitos adversos associados à utilização de produtos de branqueamento, como irritação ou úlceras nos tecidos gengivais (Minoux e Serfaty 2008). Estas lesões temporárias, cuja aparência é isquémica, podem ocorrer através do contacto do produto de branqueamento com as mucosas (Bruzell *et al.* 2013). O PH afeta os fibroblastos gengivais humanos e induz a libertação de citocinas pro inflamatórias, *in vitro* (Furukawa *et al.* 2015), facto que poderá explicar o fenómeno da irritação gengival. No entanto, esta pode ser evitada através do uso de dispositivos de isolamento como o dique de borracha, vaselina ou resinas fotopolimerizáveis e moldeiras de branqueamento que não cubram tecido gengival (Minoux e Serfaty 2008; da Mata e Marques 2006). Uma possível forma de reverter os efeitos adversos nos tecidos gengivais é através do fármaco tocoferol, amplamente conhecido como vitamina E, que demonstrou resultados favoráveis na redução da irritação gengival, por ser um agente antioxidante (Furukawa *et al.* 2015).

A sensibilidade dentária pós-branqueamento é o efeito adverso mais frequente. Este ocorre predominantemente no período inicial de tratamento, é transitório e termina algum tempo após a sua cessação. Todavia, o mecanismo pelo qual esta sensibilidade ocorre não é ainda totalmente conhecido. É geralmente atribuída à difusão de PH pelos tecidos dentários duros até à polpa, onde desencadeia uma resposta inflamatória. Aí, os mediadores inflamatórios sensibilizam os nociceptores presentes no tecido pulpar, provocando uma pulpite reversível e, por conseguinte, dor (Minoux e Serfaty 2008; Charakorn *et al.* 2009). A redução da sensibilidade dentária, reportada pelos pacientes, aquando da administração de ibuprofeno antes da aplicação de um gel de 35% de PH, suporta esta teoria – visto que o ibuprofeno é um fármaco anti-inflamatório que bloqueia a produção de prostaglandinas, moléculas pró-inflamatórias presentes na polpa inflamada. (Charakorn *et al.* 2009; Nakanishi *et al.* 2001).

d. Efeitos do peróxido de hidrogénio no complexo pulpo-dentinário

Apesar da sua vasta utilização existem, por conseguinte, reservas quanto à segurança da sua aplicação, nomeadamente os seus verdadeiros efeitos no complexo pulpo-dentinário.

Estudos *in vitro* demonstraram que a aplicação de produtos de branqueamento resulta na difusão de PH para a câmara pulpar proporcionalmente à sua concentração e ao tempo de aplicação (Soares et al. 2010; Soares, Ribeiro, et al. 2013; Benetti et al. 2004). Nos últimos anos, múltiplas publicações surgiram com o intuito de quantificar a penetração do PH e verificar os seus possíveis efeitos citotóxicos. Vários estudos *in vitro*, recorrendo a dentes bovinos, referem que a utilização de PH a 35% resulta numa difusão elevada para a câmara pulpar, bem como em significativa diminuição da viabilidade de células MDPC-23 (*Mouse Dental Pulp Cells*) (Soares, Pontes, et al. 2013; Soares, Ribeiro, et al. 2013; Soares, Basso, et al. 2014; Soares et al. 2014). Num destes estudos, foram não só usadas células MDPC-23 como também humanas, HDPC (*Human Dental Pulp Cells*); nestas o efeito citotóxico do PH foi superior, atingindo 88% de morte celular num regime de 3 aplicações de 15 minutos (Soares, Basso, et al. 2014). Um estudo *in vitro*, recorrendo a dentes de bovinos e células MDPC-23 concluiu que um gel de PC a 10% aplicado 1h/dia durante 14 dias não diminuiu a viabilidade celular (Soares et al. 2010). Noutro, com PC a 10% e 16% 8h/dia durante 14 dias, após análise das culturas celulares em MEV (Microscopia Eletrónica de Varrimento) verificaram que células expostas a 10% PC tiveram alguma diminuição no volume celular; células expostas a 16% PC tinham concomitantemente restos celulares, sugerindo a toxicidade superior da aplicação de 16% PC; todavia estas alterações foram apenas encontradas até 7 dias de tratamento (Soares et al. 2011). Outro estudo, também com análise em MEV, apresentou evidência de dano celular direto, com fragmentação da membrana celular e diminuição da atividade metabólica (medida pela enzima succinato desidrogenase - SDH) em concentrações de 100 e 1000 partes por milhão (ppm) de PC. Para as concentrações de 1 e 10 ppm existiu alguma diminuição da atividade de SDH embora não tenha sido significativamente diferente do grupo controlo (de Lima et al. 2009). Isto sugere que apenas concentrações de PC a partir de 100 ppm, na câmara pulpar, têm efeitos significativamente deletérios para as células pulpares. Num outro ensaio *in vitro* que comparou 10% e 35% de

PC em dentes restaurados com técnica adesiva versus dentes íntegros, a penetração de PH foi muito superior nos restaurados (Benetti *et al.* 2004). Porém, noutro com 20% e 35% de PH não se verificaram diferenças significativas entre dentes sãos e restaurados (Soares, Pastana, *et al.* 2014).

No entanto, todos estes estudos são *in vitro* e utilizam dentes de bovinos, inteiros ou em discos. Um estudo *in vivo* usou incisivos e pré-molares humanos hígidos, programados para exodontia por motivos ortodônticos, com PH a 38%, com 3 aplicações de 15 minutos; ao realizar análises histológicas ao tecido pulpar encontraram danos irreversíveis nos incisivos (3 de 4 incisivos sofreram necrose por coagulação) mas não nos pré-molares; os autores atribuem esta ocorrência à diferença de espessuras de esmalte e dentina entre os 2 tipos de dentes (Costa *et al.* 2010). Noutro estudo *in vivo* com o mesmo regime de branqueamento, apenas realizado em pré-molares, obtiveram-se resultados semelhantes (Kina *et al.* 2010).

São vários os artigos que indiciam que a diminuição da concentração de PH, em regime de aplicação idêntico, ou do tempo de aplicação, com concentrações idênticas, reduz não só a citotoxicidade mas também a eficácia clínica (alteração de cor) (Soares, Ribeiro, *et al.* 2013; Soares, Pontes, *et al.* 2013; Soares, Basso, *et al.* 2014; Soares *et al.* 2014). Um estudo *in vitro*, em dentes bovinos, obteve resultados semelhantes quanto à alteração de cor, penetração de PH e citotoxicidade usando 35% e 20% de PH durante 45 minutos. Porém, ao aplicar 3x 15min 35% PH, a concentração de PH foi significativamente superior. Todavia, não apresentou aumento significativo na citotoxicidade nem na alteração de cor (de Almeida *et al.* 2014).

Um estudo realizado em 2005 comparou a penetração de PH entre *whitening strips* (5,3% PH) e *paint-on* (5,3 – 8,7% PH) em incisivos humanos, obtendo resultados significativamente superiores nas *whitening strips* (5,3%) ($\cong 0,7\mu\text{g}$) (Gökay *et al.* 2005); outro ensaio concluiu que a penetração de PH usando uma concentração de 14% é significativamente superior do que quando usando uma de 6,5% (Gökay *et al.* 2004).

Alguns autores propuseram a utilização de sais metálicos e outros ativadores concomitantemente com o PH, com o intuito de acelerar e amplificar a reação entre PH e a estrutura dentária, resultando num branqueamento mais eficaz com menor difusão de PH para

a câmara pulpar, por haver menor número de moléculas livres que não reagiram. (Travassos *et al.* 2010; Duque *et al.* 2014).

e. Pressão pulpar positiva

Todavia, até ao momento não existe nenhum estudo acerca da concentração pulpar de PH cujo protocolo inclua um método que simule a pressão pulpar positiva (PPP) – fator que influencia a difusão de solutos através dos tecidos dentários (Soares *et al.* 2010; Vongsavan e Matthews 1991; Vongsavan e Matthews 1992). A pressão pulpar positiva foi previamente apontada como um fator presente em condições *in vivo* que justifica a aparente discrepância entre resultados *in vitro* e sintomas clínicos (Thitinanthapan *et al.* 1999; Minoux & Serfaty 2008; Costa *et al.* 2010).

Alguns autores referem valores de 25 mm Hg (34 cm de água - H₂O), em cães, ou de 15 a 20 cm H₂O em gatos, *in vivo* (Brown *et al.* 1969; Vongsavan e Matthews 1991). Baseados nos resultados de Ciucchi *in vivo* em humanos, em 1995, inúmeros estudos utilizam valores de 15 ou 20cm H₂O (Gerzina & Hume 1995; Mahdan et al. 2013; Feitosa et al. 2013; Feitosa, Correr, et al. 2012; Sauro et al. 2007) para simular a PPP. Estes valores foram encontrados em pré-molares programados para exodontia por motivos ortodônticos, em crianças com idades compreendidas entre 12 e 15 anos.

Nesta revisão da literatura não foram encontrados estudos *in vitro* que utilizem a PPP ao testar a difusão de PH através dos tecidos dentários, mas apenas no teste de sistemas adesivos (Feitosa et al. 2012; Sauro et al. 2007; Hosaka et al. 2007). Em adição, os modelos experimentais são diferentes dos utilizados neste ensaio piloto.

f. Outros fatores que influenciam difusão de produtos através dos tecidos duros dentários

Até à data, a literatura encontrada descreve outros fatores que influenciam a difusão de produtos através da dentina como tamanho molecular e área de difusão da dentina

(Gerzina & Hume 1995). Quanto ao tamanho molecular, moléculas de pequenas dimensões difundem-se melhor; um aumento do raio molecular de 19 vezes resulta numa permeabilidade 100 vezes inferior (Pashley 1979).

A área de difusão da dentina, diretamente relacionada com a densidade e diâmetro tubulares, aumenta com a proximidade à polpa, chegando aos 22% de superfície permeável (Pashley 1979). Quanto à espessura, a sua diminuição está associada a um aumento exponencial de permeabilidade (Pashley 1979). Também a concentração do soluto (pressão osmótica) e permeabilidade da barreira odontoblástica afetam a difusão de produtos através dos tecidos dentários. (Miles *et al.* 2004).

2. Objetivo e Hipóteses

1. Verificar se a pressão pulpar positiva pode alterar a quantidade de peróxido de hidrogénio que atinge a câmara pulpar através dos tecidos dentários, durante a aplicação de um produto de branqueamento *in office* com 40% de peróxido de hidrogénio.

H0: A pressão pulpar positiva não altera a quantidade de peróxido de hidrogénio que alcança a câmara pulpar.

H1: A pressão pulpar positiva reduz a quantidade de peróxido de hidrogénio que alcança a câmara pulpar.

2. Realizar uma análise de poder estatístico para determinar o número total mínimo de amostras necessárias, em cada grupo, para um ensaio futuro.

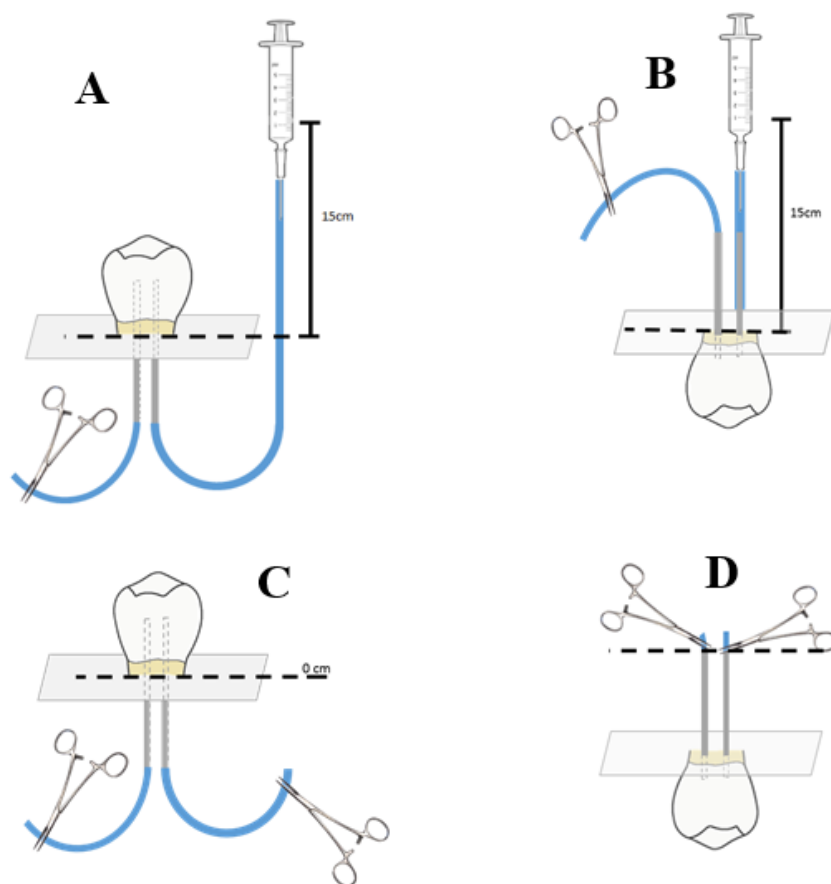
3. Materiais e Métodos

a. Procedimentos experimentais

1. Titulação do conteúdo de PH do produto de branqueamento dentário

Para a determinação da quantidade de PH que atinge a câmara pulpar foi necessário saber previamente a quantidade de PH existente nos diferentes lotes de produto de branqueamento utilizado. Foram realizadas 3 titulações para cada lote, através do método com Sulfato de Cério (IV) previamente descrito (da Silva Marques et al. 2012; Matis et al. 1999). Esperou-se a alteração de cor da solução inicialmente vermelha-alaranjada (anexo I, fig. A), no ponto de equivalência, para azul ciano (anexo I, figura B).

2. Montagem do modelo experimental de pressão pulpar positiva



Esquema 1 - Representação da montagem experimental para cada grupo. A - Dente inferior submetido a pressão positiva de 15 cm H₂O; B – Dente superior submetido a pressão positiva de 15 cm H₂O; C – Dente inferior não submetido a pressão; D – Dente superior não submetido a pressão.

Foram utilizados um total de 20 dentes humanos, caninos e pré-molares, íntegros, alocados aleatoriamente em cada grupo (Tabela 1) (GraphPad Software, Inc, EUA). Estes foram conservados numa solução de cloramina a 0,5% por um período não superior a 6 meses. Após irrigação com água destilada, as peças dentárias foram seccionadas transversalmente 2-3mm abaixo da junção amelo-cementária com recurso a um micrótomo (Isomet 1000, Buehler, Bluff, IL, EUA), após serem montadas em cilindros de resina (Sampl-Kwick, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) (ver anexo I, fig. C). A porção radicular foi descartada; à porção coronária remanescente foi-lhe removido o tecido pulpar com uma sonda reta e/ou broca esférica de turbina. De seguida, foi fixada a uma placa de policarbonato com cianoacrilato (UHU, Alemanha). A placa de policarbonato foi perfurada duas vezes de forma a permitir comunicação com o interior da câmara pulpar e, em cada orifício, inserida uma agulha *luer-slip* 21G de 25mm (BD Microlance, Becton Dickinson, EUA), com os biséis em direções opostas. A selagem da interface foi garantida com uma camada de cianoacrilato. A cada agulha foram adaptados dois segmentos de tubo de irrigação (\varnothing 0,8mm) de acordo com o esquema 2, de forma que nos grupos A e B a pressão exercida fosse 15cm H₂O, e nas C e D nula. No grupo D, a pressão pulpar foi minimizada mas diferente de 0, devido à impossibilidade de conseguir um depósito suficiente de amostra ultrapassando a força da gravidade.

Dente \ Grupo	A (N=5)	B (N=5)	C (N=5)	D (N=5)
Pré-Molar	3	3	2	2
Canino	2	2	3	3

Tabela 1 – Distribuição aleatória das amostras em cada grupo experimental, consoante o tipo de dente - pré-molar ou canino.

Os sistemas B e D visam mimetizar a posição normal de dentes superiores face aos A e C, que pretendem mimetizar os da arcada inferior. As interfaces tubo-agulha e tubo-seringa foram seladas com Parafilm (Beemis, Neenah, WI, EUA) e cianoacrilato. Os quatro sistemas diferentes foram sempre preenchidos com, no mínimo, 1mL (e com o suficiente para perfazer a coluna de água necessária) de solução tampão acetato 2M pH 4,5, preparada até sete dias antes da sua utilização. Todas as faces, exceto a vestibular, foram cobertas com uma

camada de verniz (Maybelline, Nova Iorque, EUA) de forma a impedir o contacto daquelas com o gel de branqueamento. Este, cuja massa foi previamente registada, foi aplicado na face vestibular das amostras de acordo com as indicações do fabricante de forma a mimetizar o tempo de exposição máximo: 6 aplicações de 20 minutos (Figura 1). Entre cada aplicação o gel foi removido e a amostra irrigada com água destilada e limpa com um *pellet* de algodão. No final das aplicações, a solução presente no interior do sistema foi recolhida num tubo Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e pesada. Dessa solução foram retirados volumes de 125µL posteriormente submetidos a análise espectrofotométrica para determinar a quantidade

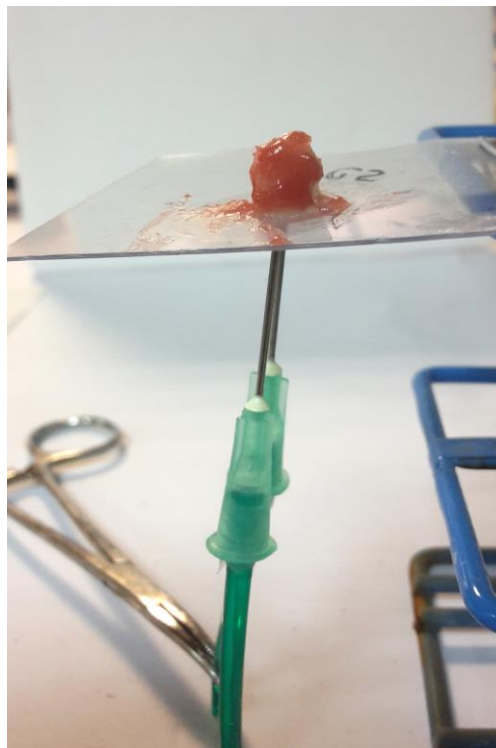


Figura 1 - Aplicação de PH na superfície vestibular de uma amostra do grupo C.

de peróxido de hidrogénio presente nas amostras. Antes da aplicação de produto de branqueamento, recolheu-se uma parcela da solução no interior de cada grupo que também foi submetida a análise espectrofotométrica, de forma a cada amostra ter o seu próprio controlo (auto-controladas).

3. Determinação da quantidade de PH que atinge a câmara pulpar

Para a determinação da quantidade de peróxido de hidrogénio que atinge a câmara pulpar é necessária a sua deteção nas amostras recolhidas. Esta foi conseguida através de um método espectrofotométrico modificado, baseado na técnica descrita por Mottola (Mottola *et al.* 1970), que utiliza como cromogénio o Leucocristal Violeta. Para a calibração do espectrofotómetro foram realizadas retas de calibração com 9 pontos em cada dia de atividade experimental. Foram aceites como válidas retas de calibração com um coeficiente de confiança igual ou superior a 99%. Para 9 tubos Falcon® (VWR, Radnor, PA, EUA)

pipetaram-se 1mL de uma solução de Leucocristal violeta 1mg.mL^{-1} à base de ácido clorídrico a 0,5%; 0,5mL de uma solução de peroxidase de rábano 200U.mL^{-1} ; 4mL de solução tampão de acetato 2M, pH entre 4,5 a 4,7. A partir de uma solução mãe de PH a 3% foi preparada uma solução padrão de PH a $3\mu\text{g.mL}^{-1}$, da qual se pipetaram volumes diferentes para cada um dos tubos de forma

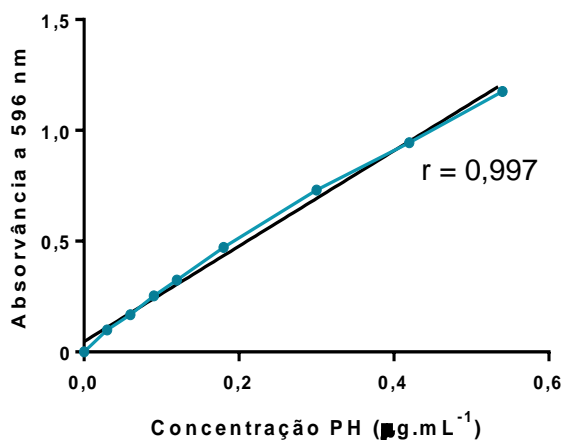


Gráfico 1 - Retas de calibração utilizadas neste estudo.

a, em cada tubo, existir uma concentração diferente de PH (0; 0,03; 0,06; 0,09; 0,12; 0,18; 0,30; 0,42; e $0,54\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os tubos preparados para receber 0,125mL de amostra não contiveram, na sua composição, solução padrão de PH. Com água desionizada do dia fez-se um volume total de 10mL. Após homogeneização num vórtex (Velp Scientifica, EUA), foram retirados 1,5mL de cada tubo para uma *cuvette* (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha), posteriormente tapada com Parafilm e submetida a análise espectrofotométrica no comprimento de onda 596nm. Os resultados foram expressos em μg .

4. Determinação do volume, espessura, áreas de aplicação e exposição de cada amostra

De forma a determinar o volume de cada câmara pulpar, as amostras foram pesadas numa balança antes e após as respectivas câmaras pulpares serem preenchidas por água desionizada. De seguida, as coroas foram submetidas a um novo corte, vertical, que as dividiu em duas metades: vestibular e palatina/lingual.

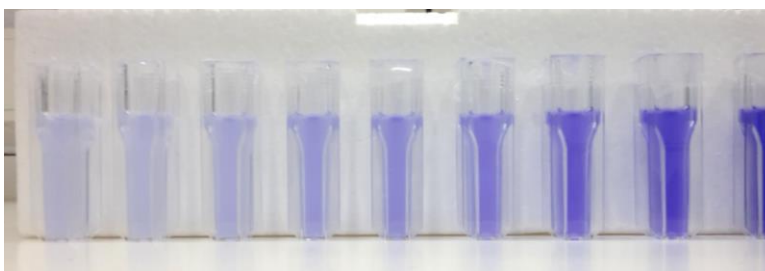


Figura 2 – Soluções da reta de calibração para a técnica de Leucocristal Violeta, com 9 pontos.

Na metade vestibular, com um espessímetro, mediu-se

a espessura de tecidos duros na câmara pulpar em 2 pontos, um cervical e outro incisal. A área aproximada da porção vestibular da câmara pulpar (área de exposição pulpar) e da face vestibular do dente, onde foi aplicado o produto, foi medida através de um *software open-*

source de medição de áreas irregulares (ImageJ, EUA). A escala foi estabelecida com uma régua milimétrica (Figura D, Anexo I).

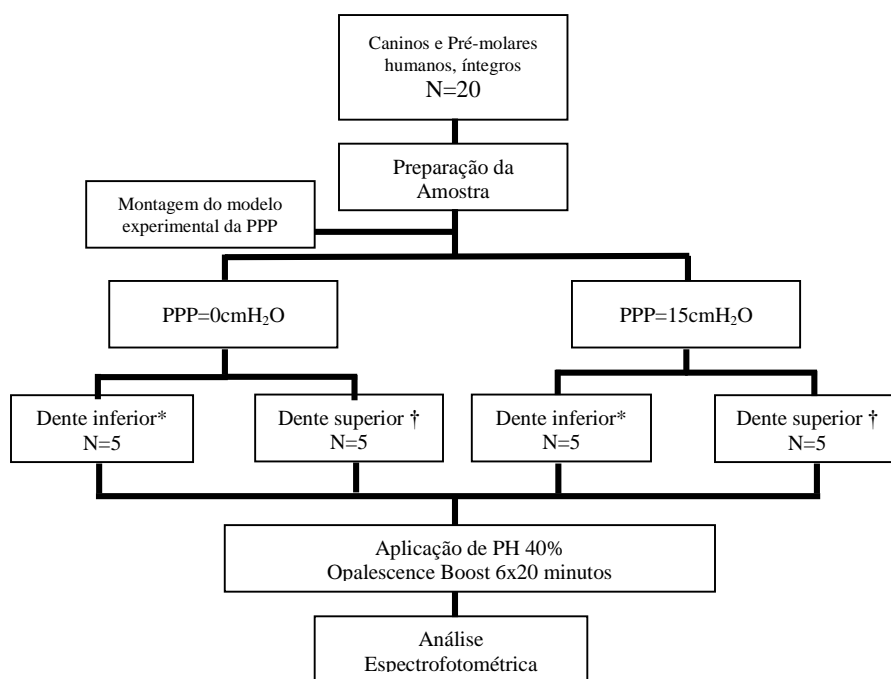
b. Variáveis

- a. Intervenção de controlo: aplicação de Opalescence Boost, Ultradent, EUA - gel de utilização em consultório, contendo 40% PH – mediante pressão pulpar nula (0cm H₂O) - controlo negativo.
- b. Intervenção de teste: aplicação de Opalescence Boost, Ultradent, EUA - gel de utilização em consultório, contendo 40% PH – mediante pressão pulpar positiva = 15cm H₂O.

Amostras: Caninos e Pré-molares humanos, íntegros.

Desfecho: Quantidade de peróxido de hidrogénio que atinge a câmara pulpar quando sujeito a pressão pulpar positiva de 15cm H₂O, expressa em µg.

Método Experimental: Espectrofotometria de luz visível, com o indicador colorimétrico Leucocristal Violeta e o catalisador peroxidase de rábano (Mottola et al. 1970).



Esquema 2- Determinação do efeito da pressão pulpar positiva na difusão de PH através dos tecidos duros dentários. *Dentes cuja coroa está orientada superiormente. † Dente cuja coroa está orientada inferiormente.

c. Análise Estatística

A análise estatística será realizada através de *software* apropriado (IBM® SPSS® Statistics 20, Inc, Chicago, IL, EUA). Os resultados serão indicados sob a forma de média, com um intervalo de confiança (IC) estabelecido de $\pm 95\%$; apenas serão considerados significativos valores de p inferiores a 0,05.

Serão realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilk e gráfico Q-Q) para averiguar se a amostra segue uma distribuição normal. Serão também utilizados os testes U de Mann-Whitney, teste de Wilcoxon e correlação de Spearman conforme apropriado.

O cálculo do poder estatístico será realizado com o auxílio de *software* apropriado (www.statisticalsolutions.net).

4. Resultados

Dos três ensaios de titulação do produto de branqueamento, lote B9Y6M, chegou-se à percentagem média de 41,78%, IC 95% [40,79; 42,75] de PH presente no gel de branqueamento, valor superior ao apresentado pelo fabricante (40%).

Os testes de Mann-Whitney não demonstraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos com e sem PPP, quanto à penetração de PH na câmara pulpar (Gráfico 2). Os testes de Wilcoxon demonstraram diferenças significativas entre as quantidades de PH aplicado na superfície dentária, recuperado após realização do protocolo de branqueamento e detetado previamente ao início da aplicação de PH ($p < 0,05$).

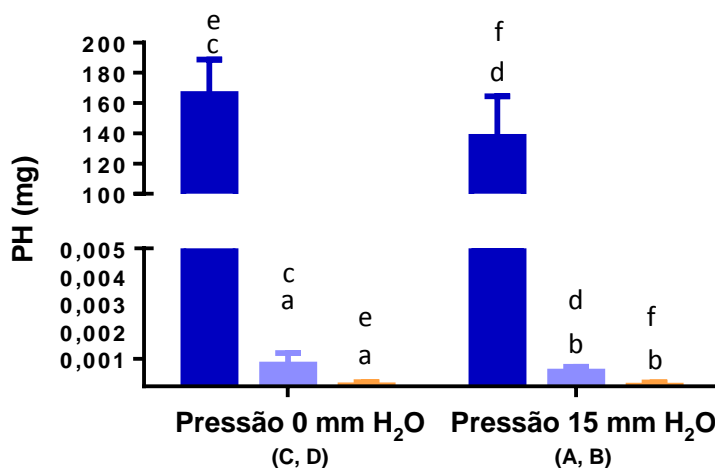


Gráfico 2 - Comparação das médias, em miligramas, de: massa de PH inicialmente aplicado (azul escuro), massa de PH recuperado antes (controlo, laranja) e após o protocolo de branqueamento (azul claro) e o PH detetado antes da aplicação de qualquer produto de branqueamento (laranja), que atuou como o próprio controlo de cada amostra. Letras iguais demonstram diferenças significativas dentro da variável pressão “0” ou “15” ($p < 0,05$).

Com os resultados obtidos de 0,0008 e 0,0005 miligramas de PH recuperado da câmara pulpar, com um desvio padrão de 0,0006 e 0,00023, respetivamente, e com 10 elementos por grupo, o poder estatístico é de 43,3%. Ou seja, existem 56,7% de probabilidades de se ter cometido um erro do tipo II – apesar de não terem sido encontradas diferenças, estas podem existir, mas o poder de as detetar é demasiado reduzido pelo tamanho da amostra. Em estudos futuros, para detetar uma diferença de 0,0003 miligramas de PH

recuperado, com um alfa (nível de significância) de 5% e um poder de 80% serão necessários 30 amostras por grupo para a hipótese bidirecional.

Quanto à percentagem de PH recuperado, face à quantidade aplicada em cada dente, também não existiram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos com PPP (A e B) e sem pressão pulpar (C e D) (Gráfico 3).

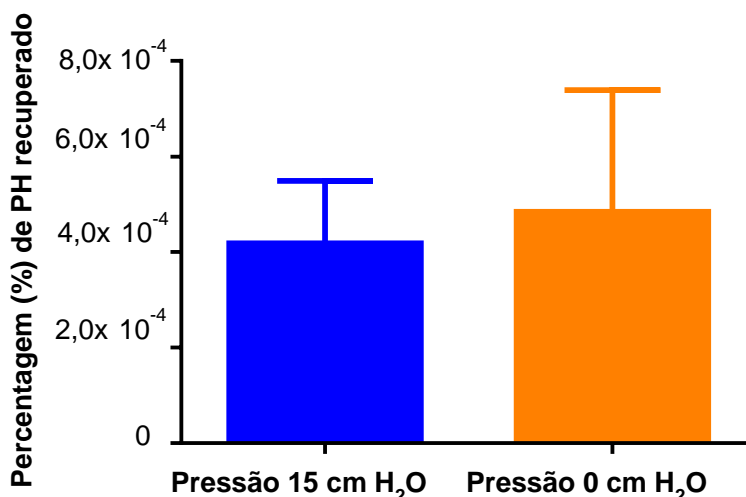


Gráfico 3 – Média da percentagem de PH recuperado na câmara pulpar, a partir do PH aplicado no gel de branqueamento, nos grupos com pressão (azul) e sem pressão (laranja).

Não se verificaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a quantidade de PH recuperado em cada grupo experimental (Gráfico 4).

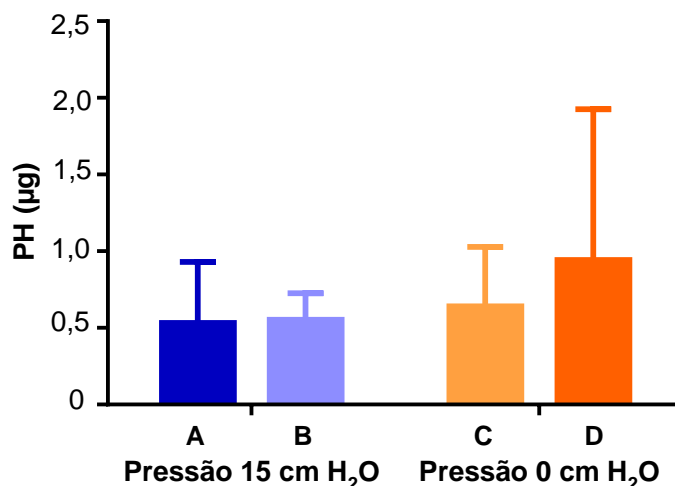


Gráfico 4 – Média da quantidade, em microgramas, de PH recuperado em cada grupo experimental após o protocolo de branqueamento.

Foram realizadas análises de correlação de Spearman entre PH recuperado e: espessura dentária, volume da câmara e áreas de aplicação e exposição. Não se verificaram correlações significativas entre eles ($p > 0,05$), provavelmente devido a um número de amostras diminuto.

5. Discussão

Os resultados obtidos neste ensaio piloto sugerem que a PPP pode influenciar a quantidade de PH que chega à câmara pulpar. Nos grupos com PPP de 15 cm H₂O, verificaram-se valores inferiores de PH pulpar, os quais não foram significativamente diferentes dos grupos com pressão nula (Gráficos 3 e 4). A ausência de diferenças estatísticas pode ser devido à reduzida dimensão da amostra, que não permite tirar ilações robustas acerca do tema. Sendo este um estudo piloto, serviu para determinar através de uma análise de cálculo de amostra, que um estudo futuro necessitará no mínimo de 30 amostras por cada grupo em estudo. Contudo, com base nos resultados preliminares, existe plausibilidade biológica para a pressão pulpar interferir na difusão do PH devendo, de futuro, realizar-se um estudo com a dimensão amostral previamente definida.

As diferenças verificadas entre PH aplicado na superfície dentária e PH recuperado ($p < 0,05$) do interior da câmara pulpar (Gráficos 2 e 3) sugerem que efetivamente o PH atravessa os tecidos dentários durante o período de aplicação do produto de branqueamento. A sua deteção, em concentrações mensuráveis, no interior da câmara pulpar permite aferir que nem todas as moléculas de PH se decompuseram e reagiram com a estrutura dentária, sendo difundidas intactas para a cavidade pulpar (Mena-Serrano et al. 2015). No entanto, não são apenas estas moléculas que podem ser responsáveis pelos efeitos deletérios nos odontoblastos e tecidos pulpares; neste desenho de estudo não foi possível detetar os radicais livres presentes na solução recolhida da câmara pulpar.

Na literatura existente estão descritos os efeitos citotóxicos de diferentes concentrações de PH. Concentrações de 2,22 µg.mL⁻¹ de PH durante 60 minutos levaram a

uma diminuição de 38,5% do metabolismo de células MDPC-23; concentrações de 29,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PH diminuíram em 78% o metabolismo destas células e causaram danos celulares diretos (de Lima et al. 2009). No presente estudo foi obtida uma concentração média de 67,24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos grupos submetidos a PPP - superior às concentrações citotóxicas reportadas na literatura -, o que sugere a sua citotoxicidade.

Na revisão da literatura, não foram encontrados outros estudos publicados em que seja testado o efeito da PPP na difusão de PH através dos tecidos dentários. Gokay, em 2005, reportou a recolha de 0,443 μg de PH ao aplicar um produto paint-on com 8.7% PH (Gökay et al. 2005). Outro estudo, com um produto de concentração e protocolo de aplicação idênticos, obteve 0,398 μg PH (Bharti & Wadhwani 2013). Benetti, em 2004, com uma aplicação de um gel com 35% CP (correspondente a 12% PH) durante 60 minutos reporta 0,131 μg de PH recuperado (Benetti et al. 2004). Os resultados do presente estudo estão de acordo com os valores previamente reportados na literatura, embora ligeiramente superiores (Gráfico 2), facto justificado pela diferença entre protocolos de aplicação, concentração de PH e tipo de produto de branqueamento.

A consideração da PPP neste estudo *in vitro* permite aproximá-lo, em parte, da situação que ocorre *in vivo*. O modelo experimental utilizado permite simular a existência de PPP em dentes superiores e inferiores (ver esquema 2). Este modelo permite ainda obter um sistema de tubagens fechado que facilita a recolha e pipetagem de volumes ao ampliar as dimensões da câmara pulpar.

Por este ser um estudo piloto *in vitro*, tem limitações que lhe são inerentes. Deste modo, existem múltiplos fatores que não foram reproduzidos, como o *turnover* do fluido intersticial, devido ao fluxo capilar contínuo na câmara pulpar de 0,17 mL.min^{-1} por grama de tecido (Berggreen et al. 2010). A sua renovação permanente é uma explicação plausível para a falta de evidência clínica, até ao momento, de pulpite irreversível associada a branqueamentos externos (Costa et al. 2010; Kina et al. 2010). Contudo, alterações na circulação pulpar que resultem na redução do fluxo sanguíneo podem causar acumulação de substâncias tóxicas na cavidade pulpar; este facto pode explicar a sensibilidade pós-operatória transitória em procedimentos restauradores ou branqueadores (Pashley 1979). Em

adição, a polpa tem a capacidade de produzir agentes anti-oxidantes, como a enzima catalase, que diminuem a concentração pulpar de PH (Esposito et al. 2003).

Este desenho de estudo não permitiu a padronização da espessura de dentina e/ou esmalte, visto que na natureza existe variabilidade; contudo, a espessura de tecidos duros foi registrada. Não existiram diferenças significativas de espessura entre os quatro grupos experimentais ($p > 0,05$).

No presente ensaio experimental, não existiram diferenças significativas entre dentes pré-molares e caninos, quanto à quantidade de PH recuperado na câmara pulpar, o que sugere que o padrão de difusão entre os dois tipos de dente é semelhante. Todavia, a quantidade recuperada nos caninos foi superior à recuperada nos pré-molares na presença de pressão positiva ou nula. Neste estudo não foram utilizados incisivos centrais ou laterais, dentes com menor espessura vestibular, que por este motivo poderão apresentar um diferente padrão de difusão (Costa et al. 2010).

Neste ensaio piloto, a recolha do conteúdo da câmara pulpar foi feita imediatamente após o término do protocolo de branqueamento. No entanto, sabe-se que a difusão de PH através dos tecidos dentários continua a desenrolar-se até 5 dias após a aplicação do produto de branqueamento, tendo o seu pico de difusão na primeira hora após a sua aplicação; os dentes de indivíduos jovens têm maior taxa de difusão (Camps et al. 2007). Para melhor compreender o efeito do tempo na quantidade de PH que atinge a câmara pulpar seria necessário fazer um estudo com *follow-up*, em intervalos pré-definidos.

Assim sendo, e com base nas limitações acima descritas e nos resultados preliminares obtidos, propõe-se que futuramente seja realizado um estudo *in vitro* com 30 amostras (dentes humanos íntegros pré-molares, caninos, incisivos centrais e laterais) em cada grupo, com *follow-up* adequado e reprodução do *turnover* do fluido intersticial. Complementarmente, deverão ser registados os seguintes dados de cada amostra: espessura da face vestibular, volume da câmara pulpar e áreas de aplicação e exposição.

6. Conclusão

Considerando as limitações deste estudo acima apontadas, é possível concluir que:

- A presença de pressão pulpar positiva leva a uma diminuição, embora não estatisticamente significativa, da quantidade de PH que atingiu a câmara pulpar através dos tecidos dentários após aplicação de PH a 40%.
- Para um estudo futuro serão necessárias, no mínimo, 30 amostras em cada grupo experimental.

7. Referências Bibliográficas

- De Almeida, L.C.A.G. et al., 2014. Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. *Clinical oral investigations*.
- Alqahtani, M.Q., 2014. Tooth-bleaching procedures and their controversial effects: A literature review. *The Saudi dental journal*, 26(2), pp.33–46.
- Babior, B.M. & Curnutte, J.T., 1987. Chronic granulomatous disease--pieces of a cellular and molecular puzzle. *Blood reviews*, 1(4), pp.215–8.
- Benetti, A.R. et al., 2004. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *International endodontic journal*, 37(2), pp.120–4.
- Berggreen, E., Bletsa, A. & Heyeraas, K., 2010. Circulation in normal and inflamed dental pulp. *Endodontic Topics*, 17(1), pp.2–11.
- Bharti, R. & Wadhvani, K., 2013. Spectrophotometric evaluation of peroxide penetration into the pulp chamber from whitening strips and gel: An in vitro study. *Journal of conservative dentistry : JCD*, 16(2), pp.131–4.
- Brown, A.C. et al., 1969. Tooth pulp transcapillary osmotic pressure in the dog. *Archives of oral biology*, 14(5), pp.491–502.
- Bruzell, E.M. et al., 2013. Side effects of external tooth bleaching: a multi-centre practice-based prospective study. *British dental journal*, 215(9), p.E17.
- Camps, J. et al., 2007. Time-course diffusion of hydrogen peroxide through human dentin: clinical significance for young tooth internal bleaching. *Journal of endodontics*, 33(4), pp.455–9.
- Charakorn, P. et al., 2009. The effect of preoperative ibuprofen on tooth sensitivity caused by in-office bleaching. *Operative dentistry*, 34(2), pp.131–5.
- Costa, C.A. de S. et al., 2010. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 109(4), pp.e59–64.
- Dahl, J.E. & Pallesen, U., 2003. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 14(4), pp.292–304.

- Dannemand, K. & Ozhayat, E.B., 2014. Recognition of patient-reported impairment in oral aesthetics. *Journal of oral rehabilitation*, 41(9), pp.692–9.
- Duque, C.C. de O. et al., 2014. Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel. *Clinical oral investigations*, 18(6), pp.1631–7.
- Esposito, P. et al., 2003. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *European Journal of Oral Sciences*, 111(5), pp.454–456.
- Feitosa, V.P., Correr, A.B., et al., 2012. Effect of a new method to simulate pulpal pressure on bond strength and nanoleakage of dental adhesives to dentin. *The journal of adhesive dentistry*, 14(6), pp.517–24.
- Feitosa, V.P., Leme, A.A., et al., 2012. Hydrolytic degradation of the resin-dentine interface induced by the simulated pulpal pressure, direct and indirect water ageing. *Journal of dentistry*, 40(12), pp.1134–43.
- Feitosa, V.P. et al., 2013. Two methods to simulate intrapulpal pressure: effects upon bonding performance of self-etch adhesives. *International endodontic journal*.
- Furukawa, M. et al., 2015. Cytotoxic Effects of Hydrogen Peroxide on Human Gingival Fibroblasts In Vitro. *Operative dentistry*.
- Gerzina, T.M. & Hume, W.R., 1995. Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. *Journal of dental research*, 74(1), pp.369–73.
- Gökay, O., Müjdecı, A. & Algn, E., 2005. In vitro peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *International endodontic journal*, 38(8), pp.516–20.
- Gökay, O., Müjdecı, A. & Algn, E., 2004. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *Journal of endodontics*, 30(12), pp.887–9.
- Hasson, H., Ismail, A.I. & Neiva, G., 2006. Home-based chemically-induced whitening of teeth in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*, (4), p.CD006202.
- Haywood, V.B., 2006. Nightguard Vital Bleaching: Indications and Limitations. *US Dentistry*, pp.2–8.
- Haywood, V.B. & Heymann, H.O., 1989. Nightguard vital bleaching. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, 20(3), pp.173–6.

- Hosaka, K. et al., 2007. Effect of simulated pulpal pressure on all-in-one adhesive bond strengths to dentine. *Journal of dentistry*, 35(3), pp.207–13.
- Kihn, P.W., 2007. Vital tooth whitening. *Dental clinics of North America*, 51(2), pp.319–31, viii.
- Kina, J.F. et al., 2010. Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching. *International endodontic journal*, 43(7), pp.572–80.
- De Lima, A.F. et al., 2009. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 90(2), pp.907–12.
- Mahdan, M.H.A. et al., 2013. Combined effect of smear layer characteristics and hydrostatic pulpal pressure on dentine bond strength of HEMA-free and HEMA-containing adhesives. *Journal of dentistry*, 41(10), pp.861–71.
- Marques, D., 2008. *Efectos del peróxido de hidrógeno em la fisiologia celular de la cavidad oral: estudio funcional y clínico*. Universidad de Extremadura.
- Da Mata, A.D.S.P. & Marques, D.N. da S., 2006. A novel technique for in-office bleaching with a 6% hydrogen peroxide paint-on varnish. *The European journal of esthetic dentistry : official journal of the European Academy of Esthetic Dentistry*, 1(1), pp.70–7.
- Matis, B.A. et al., 1999. In vivo degradation of bleaching gel used in whitening teeth. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 130(2), pp.227–35.
- Meireles, S.S. et al., 2014. Changes in oral health related quality of life after dental bleaching in a double-blind randomized clinical trial. *Journal of dentistry*, 42(2), pp.114–21.
- Mena-Serrano, A. et al., 2015. Effects of the Concentration and Composition of In-office Bleaching Gels on Hydrogen Peroxide Penetration into the Pulp Chamber. *Operative dentistry*.
- Miles, T.S., Nauntofte, B. & Svensson, P., 2004. *Clinical Oral Physiology* 1.^a ed., Quintessence Pub Co.
- Minoux, M. & Serfaty, R., 2008. Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, 39(8), pp.645–59.
- Mottola, H.A., Simpson, B.E. & Gorin, G., 1970. Absorptiometric determination of hydrogen peroxide in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst. *Analytical Chemistry*, 42(3), pp.410–411.

- Nakanishi, T. et al., 2001. An immunohistological study on cyclooxygenase-2 in human dental pulp. *Journal of endodontics*, 27(6), pp.385–8.
- Oliveira, M.A.V.C. de et al., 2012. Effects of bleaching agents and adhesive systems in dental pulp: a literature review. *Braz J Oral Sci*, 11(4), pp.428–432.
- Pashley, D.H., 1979. The influence of dentin permeability and pulpal blood flow on pulpal solute concentrations. *Journal of endodontics*, 5(12), pp.355–61.
- Sauro, S. et al., 2007. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*, 23(6), pp.705–13.
- SCCNFP, 1999. Opinion concerning hydrogen peroxide and hydrogen peroxide releasing substances used in oral care products - adopted by the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers during the plenary session of 23 June 1999. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions/sccnfp_opinions_97_04/sccp_out83_en.htm [Acedido Junho 13, 2015].
- Da Silva Marques, D.N. et al., 2012. Kinetic release of hydrogen peroxide from different whitening products. *The European journal of esthetic dentistry : official journal of the European Academy of Esthetic Dentistry*, 7(3), pp.344–52.
- Soares, D. et al., 2010. Avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária de um gel de peróxido de carbamida a 10%. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent*, 64(3), pp.210–214.
- Soares, D., Basso, F.G., et al., 2014. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *Journal of dentistry*, 42(2), pp.185–98.
- Soares, D., Basso, F.G., et al., 2014. Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentine. *Journal of dentistry*, 42(3), pp.351–8.
- Soares, D., Ribeiro, A.P.D., et al., 2013. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clinical oral investigations*, 17(8), pp.1901–9.
- Soares, D., Pastana, J.V., et al., 2014. Influence of adhesive restorations on diffusion of H₂O₂ released from a bleaching agent and its toxic effects on pulp cells. *The journal of adhesive dentistry*, 16(2), pp.123–8.
- Soares, D., Pontes, E., et al., 2013. Low toxic effects of a whitening strip to cultured pulp cells. *American journal of dentistry*, 26(5), pp.283–5.

- Soares, D. et al., 2011. Transenamel and transdental cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells. *International endodontic journal*, 44(2), pp.116–25.
- Thitinanthapan, W., Satamanont, P. & Vongsavan, N., 1999. In vitro penetration of the pulp chamber by three brands of carbamide peroxide. *Journal of esthetic dentistry*, 11(5), pp.259–64.
- Travassos, A.C. et al., 2010. In vitro assessment of chemical activation efficiency during in-office dental bleaching. *Operative dentistry*, 35(3), pp.287–94.
- Vongsavan, N. & Matthews, B., 1992. Fluid flow through cat dentine in vivo. *Archives of oral biology*, 37(3), pp.175–85.
- Vongsavan, N. & Matthews, B., 1991. The permeability of cat dentine in vivo and in vitro. *Archives of oral biology*, 36(9), pp.641–6.

Anexos

ANEXO I – Fotografias



Figura A – Titulação de PH com sulfato de cério (IV) 0,1M, antes do ponto de equivalência. É possível observar a cor vermelho-alaranjada da solução



Figura B – Titulação de PH com sulfato de cério (IV) 0,1M, no ponto de equivalência. É possível observar a cor azul ciano da solução.



Figura C – Peças dentárias montadas em cilindros de resina, prontas para serem submetidas ao corte.

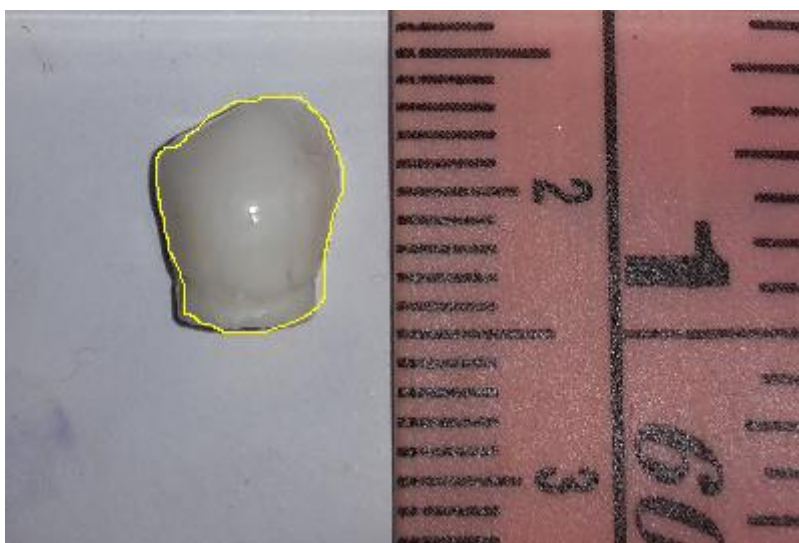


Figura D – Desenho do perímetro da face vestibular, pelo utilizador, através de *software open-source* de cálculo de áreas irregulares, com escala milimétrica.